

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 3月18日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-074316  
[ST. 10/C]: [JP2003-074316]

出 願 人  
Applicant(s): 岡田 秀親  
岡田 則子

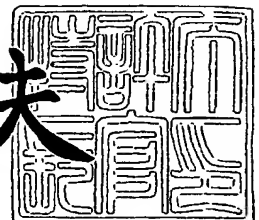
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 8月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 C00669  
【提出日】 平成15年 3月18日  
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【請求項の数】 5  
【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号エクレール桜  
山206

【氏名】 岡田 則子

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号エクレール桜  
山206

【氏名】 岡田 秀親

【特許出願人】

【識別番号】 593186459

【氏名又は名称】 岡田 秀親

【特許出願人】

【識別番号】 502282571

【氏名又は名称】 岡田 則子

【代理人】

【識別番号】 100083932

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣江 武典

【電話番号】 058-276-2122

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100121429

【弁理士】

【氏名又は名称】 宇野 健一

【電話番号】 058-276-2122

## 【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-227953

【出願日】 平成14年 7月 1日

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014605

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 包括委任状 1

【援用の表示】 平成15年3月18日提出の、各包括委任状提出書に添付のものを援用する。

【包括委任状番号】 0303037

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体及びHIV感染症治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HIV感染細胞を特異的に認識し、アポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】 HIV感染細胞を特異的に認識し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体を有効成分として含有することを特徴とするHIV感染症治療剤。

【請求項 3】 AIDSの発症を防止するためのものである請求項 2 記載の治療剤。

【請求項 4】 HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 1 の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。

【請求項 5】 HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 2 の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HIV感染細胞に特異的に反応し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgMモノクローナル抗体及びかかる抗体を有効成分として含有するHIV感染症治療剤に関する。

【0002】

【従来技術】

HIV感染症に対しては、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼインヒビターとして種々の薬剤が開発されている。これらの薬剤を3種類ないし4種類を併用する多剤併用療法（HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy）がHIV感染患者に有効性を発揮し、血中HIV量の激減やCD4リンパ球量の改善などをもたらすことが出来るようになった。しかし、多剤併用療法によっても潜伏感染細胞は排除することはできず、HIV感染患者を完全に治癒させることは難しく、HIVが潜伏

感染した細胞は、薬剤投与を中止するとHIVは再燃して増殖するという問題があった。

#### 【0003】

多剤併用療法を間欠的に中断再開を繰り返すとHIVに対する免疫応答が効率良く誘導される場合のあることが報告されているが、確実な治療法とはなっていない。これは、HIVに対する免疫反応の重要性を示している知見である。

#### 【0004】

HIV感染細胞に特異的に反応するヒト（型）モノクローナル抗体は、遺伝子組換えによりヒト型化した抗体が作成されているが、それらはIgGタイプの抗体である。それらは、HIVの感染を阻害する中和抗体であるが、感染細胞を傷害することとは出来ない。

#### 【0005】

ヒトの細胞膜の上には、種特異的補体制御膜因子群（DAF, Decay accelerating factor; MCP, Membrane cofactor protein; HRF20, 20kDa Homologous restriction factorなど）が存在するが、同種のヒト補体の反応を防ぐために、補体反応を介した細胞溶解反応は起こらない。

#### 【0006】

一方、HIV感染細胞に反応するヒト血清中のIgM抗体は、HIV感染細胞を補体制御膜因子群に打ち勝ってヒト補体を介した細胞溶解反応を起こせることが発見された。HIV感染によって発現が高まるGM2やGg4などのガングリオシドに対してIgM抗体がそのような作用を発揮することを知った（特許文献1）。

#### 【0007】

前記ガングリオシドのGM2に対するヒトIgMモノクローナル抗体としてEBウイルスで不死化したヒトBリンパ芽球株が産生するL55が報告されている。このヒトIgMモノクローナル抗体を作用させたHIV感染細胞はヒト補体の反応を介して細胞溶解を起こすことがわかった。しかし、L55抗体はHIV感染細胞に特異的なわけではないので、HIV感染細胞以外の正常細胞にも反応する可能性がある。

#### 【0008】

【特許文献1】 特開平9-227409（第2頁段落「0009」）

**【 0 0 0 9 】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、HIV感染細胞に特異的に反応し、感染細胞にアポトーシスを誘導して破壊に導くヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染患者治療剤等を提供することにある。

**【 0 0 1 0 】****【課題を解決するための手段】**

上記の課題を解決するための本発明の第 1 の解決手段として、HIV感染細胞を特異的に認識しアポトーシスを誘導するヒトIgMに属することを特徴とするモノクローナル抗体を提供する。

**【 0 0 1 1 】**

また、本発明の第 2 の解決手段は、HIV感染細胞を特異的に認識し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導ヒトIgM抗体を有効成分として含有することを特徴とするHIV感染症治療剤を提供する。

**【 0 0 1 2 】**

本発明の第 3 の解決手段は、AIDSの発症を防止するためのものである請求項 2 記載の治療剤を提供する。

**【 0 0 1 3 】**

本発明の第 4 の解決手段は、HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 1 の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

**【 0 0 1 4 】**

さらに、本発明の第 5 の解決手段は、HIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号 2 の核酸配列を有する2G9抗体であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

**【 0 0 1 5 】****【本発明の実施の態様】**

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

#### 【0016】

本発明者らは、上記課題を解決するために、ヒトの免疫グロブリンに関する遺伝子を含む染色体を導入したキリンビール社製のマウス（TCマウス：trans-chromosome mouse）にHIV感染細胞を免疫して、HIV感染細胞に特異的に反応するヒト抗体を産生するマウスをえた。この免疫マウスの脾細胞をマウス骨髄腫細胞株と融合させてハイブリドーマを定法に従って作成した。得られたハイブリドーマの中からHIV感染細胞に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンを選び出し、そのハイブリドーマクローンを2G9細胞株と命名した。2G9細胞株が産生するモノクローナル抗体である2G9はヒト $\mu$ 鎖とヒト $\kappa$ 鎖から成るヒトIgMモノクローナル抗体である。2G9はHIV感染細胞に特異的に反応するが、潜伏感染細胞株のOM10.1にも反応でき、これらの細胞にアポトーシスを誘導して破壊することができることを確認し、本発明を完成するに至った。

#### 【0017】

2G9と反応する抗原（2G9抗原）は、Western blottingで80kDa程度の分子量であると推定された。

#### 【0018】

2G9をコードする $\kappa$ 鎖及び $\mu$ 鎖それぞれにおける可変領域の遺伝子の塩基配列についての解析結果は、表1に示すごとくである。定常領域については、既報の塩基配列とほぼ同様である。

#### 【0019】

（表1）

$\mu$ 鎖可変領域の塩基配列：

TGCCCTGGATTCCAAGGCCTATCCACTTGGTGATCAGCACTGAGCACCGAGGATTCACCATGGAAGTGGGGC  
TCCGCTGGGTTTTCTTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
GCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATAGCA  
TGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACA  
TATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC

AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTTATAGCAGTGGCTG  
GCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

---

$\kappa$  鎖可変領域の塩基配列:

CTCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAG  
ATACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA  
TCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA  
AACTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA  
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAAGTATAACA  
GTGCCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

【0020】

OM10.1細胞を含め、HIV感染細胞に対して請求項1に記載の抗体、たとえば2G9抗体はアポトーシスを惹起させる特徴を有している。すなわち、これはHIV感染細胞を特異的にアポトーシスに陥らせることが出来るヒトIgMモノクローナル抗体であり、OM10.1細胞等のHIV潜伏感染細胞などに対してもアポトーシスを誘導することができるので、化学療法剤が効果を発揮することが出来ないHIV感染患者の体内に潜むHIV潜伏感染を排除するための治療剤としても使用することが出来る。

【0021】

本発明のHIV感染細胞に特異的に反応し、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導して破壊に導く、ヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染患者治療剤等に利用するための治療剤は、生理学的なキャリアと組み合わせることによって得ることができる。生理学的に受容可能なキャリアは当該分野で周知であり、そして生理学的緩衝化食塩水もしくは他の緩衝作用を有する水溶液、又は溶媒、あるいはグリコール、グリセロール、油（例えば、オリーブ油）、又は注射可能な有機エステルのような溶剤を含む。生理学的に受容可能なキャリアはペプチドを安定化させるか、吸収を増大させる化合物をも含む。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、グルコース、スクロース、又はデキストラン等の糖類、アスコルビン酸、又はグルタチオン等の抗酸化剤、キレート剤、あるいはアルブミン等のタ



ンパク質、または他の安定化剤、賦形剤を含む。さらに、逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤等の他の生理活性物質を添加することも可能である。生理学的に受容可能なキャリアの選択は、投与経路、対象疾患によりそれぞれに組み合わせることができる。

#### 【0022】

##### 【実施例1】 2G9抗体の特異性

2G9抗体による、HIV感染細胞に対する反応性をフローサイトメトリー法で解析した。培養細胞株であるU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞を被験細胞として用いた。HIV感染細胞としては、U937細胞にHIV-1のIIIB株を感染させたU937/IIIB、臨床分離株のmomo株を感染させたU937/momo、MN株を感染させたU937/MNおよび、MOLT-4にIIIB株を感染させたMOLT-4/IIIBなどを用いた。それぞれの細胞に2G9抗体を作用させて洗浄後、蛍光色素で標識した抗ヒトIgM抗体で染色し、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。その結果、2G9抗体はHIV感染細胞のU937/IIIB、U937/momo、U937/MNおよびMOLT-4/IIIBを強く染色したが、非感染のU937細胞、MOLT-4細胞およびCEM細胞に対しては全く染色性を示さなかった。さらに、正常人の末梢血リンパ球および末梢血リンパ球をフィトヘモアグルチニン（PHA）で刺激して3日間培養した活性化リンパ球などについても解析を行ったが、これらも2G9抗体とは反応しなかった。したがって、2G9抗体はHIV感染細胞に特異的に反応するが、正常細胞には反応しないことが明らかとなった。さらに、OM10.1細胞はHIV潜伏感染細胞株とされ、gp120などのHIVの抗原は通常は発現していない。ところが、2G9抗体はOM10.1細胞に対して反応したので、潜伏感染状態の細胞に対しても図1に示すように、2G9抗体が反応しうることが明らかになった（図1）。

#### 【0023】

##### 【実施例2】 2G9抗体によるHIV感染細胞のアポトーシス

HIV-1を感染させたMOLT-4/IIIB細胞を20%非働化ヒト血清を添加したRPMI1640培地に  $5 \times 10^5$ /mlに調製し、これに6.25  $\mu$ g/mlの2G9抗体を等容量加えて2日間5%炭酸ガス培養器中(37度C)で培養した。培養後、アポトーシス検出試薬であるAnnexin Vで染色した後、1%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定してフローサ

イトメトリーで解析した。図2に示すように、2G9抗体を作用させてないときには2.9%の染色度であったものが、2G9抗体の存在下で培養した時には53.5%の染色度を示し、2G9抗体には、感染細胞に対してアポトーシスを誘導する作用があることが認められた。非感染細胞のU937やMOLT-4細胞に対してはこのような傷害作用を示さなかった(図2)。

#### 【0024】

##### 【実施例3】2G9抗体によるHIV潜伏感染細胞のアポトーシス

HIV-1潜伏感染細胞株であるOM10.1細胞を20%非働化ヒト血清を含む細胞培養液(RPMI1640培地)中に  $1 \times 10^5$ /mlに調製し、これに12.5  $\mu$ g/mlの2G9抗体を等容量加えて2日間37度で培養した。培養後、アポトーシス検出試薬であるAnnexin Vで染色したあと、1%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定してフローサイトメトリーで解析した。その結果、図3に示すように、2G9抗体を作用させてないときには5.8%の染色度であったものが、2G9抗体の存在下で培養した時には22.8%の染色度を示し、2G9抗体には、HIV-1潜伏感染細胞のOM10.1細胞に対してもアポトーシスを誘導する作用があることが認められた(図3)。

#### 【0025】

##### 【実施例4】抗体の遺伝子工学的手法を用いた再構築

表1に示した2G9抗体可変領域の塩基配列を基にして2G9抗体を再構築する方法は、以下に示すshot-gun ligation method (Grundstrom, T. et al. Nucleic Acid Res. 13, 3305-3316 (1985))等の遺伝子工学的手法を用いて2G9抗体を産生する細胞株を樹立する方法を例示する。

#### 【0026】

表記の塩基配列を翻訳し、2G9抗体の可変領域のアミノ配列を得る。2G9抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列はオリジナルの2G9抗体可変領域の塩基配列に加えて、さらにその使用コドンを変化させることにより表2に示すように多種存在する。それらの中からオリゴヌクレオチドとして化学合成可能な適当な長さ毎に、ある種の制限酵素認識断片を持つものを選び出した(表2)。

。

#### 【0027】

(表2) 2G9抗体のアミノ酸配列と同等のアミノ酸をコードするcDNA一例

1  
M E L G L R W V P L V A I L E G V Q C E  
ATA GAA TTA GGT TTA CGT TGA GTT TTT TTA GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTT CAA TGT GAA  
ATG GAG TTG GGC TTG CGC TGG GTC TTC TTG GTC GCC ATC TTG GAG GGC GTC CAG TGC GAG  
CTT GGA CTT CGA GTA CTT GTA GCA CTT GGA GTA  
CTC GGG CTC CGG GTG CTC GTG GCG CTC GGG GTG  
CTA CTA CTA CTA  
CTG CTG CTG CTG

21  
V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S  
GTT CAA TTA GTT GAA TCT GGT GGT GGT TTA GTT AAA CCT GGT GGT TCT TTA CGT TTA TCT  
GTC CAG TTG GTC GAG TCC GGC GGC GGC TTG GTC AAG CCC GGC GGC TCC TTG CGC TTG TCC  
GTA CTT GTA TCA GGA GGA GGA CTT GTA CCA GGA GGA TCA CTT CGA CTT TCA  
GTG CTC GTG TCG GGG GGG GGG CTC GTG CCG GGG GGG TCG CTC CGG CTC TCG  
CTA AGT CTA AGT CTA AGT  
CTG AGC CTG AGC CTG AGC

41  
C A A S G F T F S T Y S M N W V R Q A P  
TGT GCT GCT TCT GGT TTT ACT TTT TCT ACT TAT TCT ATA AAT TGA GTT CGT CAA GCT CCT  
TGC GCC GCC TCC GGC TTC ACC TTC TCC ACC TAC TCC ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCC CCC  
GCA GCA TCA GGA ACA TCA ACA TCA GTA CGA GCA CCA  
GCG GCG TCG GGG ACG TCG ACG TCG GTG CGG GCG CCG  
AGT AGT AGT  
AGC AGC AGC

61

G K G L E W V S S I S S S S S Y I Y Y A  
 GGT AAA GGT TTA GAA TGA GTT TCT TCT ATT TCT TCT TCT TCT TCT TAT ATT TAT TAT GCT  
 GGC AAG GGC TTG GAG TGG GTC TCC TCC ATC TCC TCC TCC TCC TCC TAC ATC TAC TAC GCC  
 GGA GGA CTT GTA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA TCA GCA  
 GGG GGG CTC GTG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG GCG  
 CTA AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT  
 CTG AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC

81

D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L  
 GAT TCT GTT AAA GGT CGT TTT ACT ATT TCT CGT GAT AAT GCT AAA AAT TCT TTA TAT TTA  
 GAC TCC GTC AAG GGC CGC TTC ACC ATC TCC CGC GAC AAC GCC AAG AAC TCC TTG TAC TTG  
 TCA GTA GGA CGA ACA TCA CGA GCA TCA CTT CTT  
 TCG GTG GGG CGG ACG TCG CGG GCG TCG CTC CTC  
 AGT AGT AGT CTA CTA  
 AGC AGC AGC CTG CTG

101

Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D L L  
 CAA ATA AAT TCT TTA CGT GCT GAA GAT ACT GCT GTT TAT TAT TGT GCT CGT GAT TTA TTA  
 CAG ATG AAC TCC TTG CGC GCC GAG GAC ACC GCC GTC TAC TAC TGC GCC CGC GAC TTG TTG  
 TCA CTT CGA GCA ACA GCA GTA GCA CGA CTT CTT  
 TCG CTC CGG GCG ACG GCG GTG GCG CGG CTC CTC  
 AGT CTA CTA CTA  
 AGC CTG CTG CTG

121

I A V A G H W G Q G T L V T V S S  
 ATT GCT GTT GCT GGT CAT TGA GGT CAA GGT ACT TTA GTT ACT GTT TCT TCT  
 ATC GCC GTC GCC GGC CAC TGG GGC CAG GGC ACC TTG GTC ACC GTC TCC TCC  
 GCA GTA GCA GGA GGA GGA ACA CTT GTA ACA GTA TCA TCA  
 GCG GTG GCG GGG GGG GGG ACG CTC GTG ACG GTG TCG TCG  
 CTA AGT AGT  
 CTG AGC AGC

## 【0028】

制限酵素認識断片ごとに区切られた塩基配列を基にオリゴヌクレオチドを化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドを順次それぞれの制限酵素で消化後、ライゲーションしていくことにより2G9抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列の全長を得た。H鎖、L鎖とも同様に得られた2G9抗体可変領域のcDNA断片（それぞれ $rV_{\mu}$  2G9,  $rV_{\kappa}$  2G9）をキメラ抗体作成法と同様にヒトIgM抗体H鎖、L鎖の定常領域遺伝子配列（ $C_{\mu}$ ,  $C_{\kappa}$ ）を有するベクターに組み込み、リコンビナント2G9 $\mu$ 鎖,  $\kappa$ 鎖発現プラスミド（それぞれ $rV_{\mu}$  2G9- $C_{\mu}$ ,  $rV_{\kappa}$  2G9- $C_{\kappa}$ ）を得た（図4）。

## 【0029】

## 【実施例5】リコンビナント抗体の発現

この再構成2G9抗体遺伝子発現プラスミドによって得られる抗体活性をCOS7細胞（ATCC CRL 1651）における一時発現系で検討した。これら2種のプラスミド（ $rV_{\mu}$  2G9- $C_{\mu}$ ,  $rV_{\kappa}$  2G9- $C_{\kappa}$ ）とヒトIgM抗体J鎖発現プラスミド（ $C_j$ ）の混合物をGIBCO社製のプロトコールどおりに、リポフェクトアミン試薬を用いて遺伝子を導入した。その後、通常培養条件下で2日間培養を続け、遺伝子導入細胞の培養上清を回収した。得られた培養上清を抗ヒト $\mu$ 抗体、抗ヒト $\kappa$ 抗体を用いたサンドイッチELISA法によるアッセイ系により、培養上清中に存在するリコンビナント2G9抗体を確認した。また、この培養上清を用いてU937細胞、MOLT-4細胞およびU937細胞にHIV-1のIIIB株を感染させたU937/IIIB、MOLT-4/IIIBなどを用いてFACS解析を行って、前記した特異性を有する抗体であることを確認した。更

に、蛍光標識した基の2G9抗体とこの培養上清を同時にU937/IIIB、MOLT-4/IIIBに作用させる競合阻害試験によりリコンビナント2G9抗体の活性を確認した。

#### 【0030】

したがって、表1に示された2G9抗体の $\mu$ 鎖、 $\kappa$ 鎖可変領域の塩基配列が抗HIV活性を担う極めて重要な領域であることが確認された。

#### 【0031】

この結果から、これらの $\mu$ 鎖可変領域の塩基配列、及び $\kappa$ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子はリコンビナント抗HIV抗体を作成するにあたり極めて有用な遺伝子であることが確認された。

#### 【0032】

##### 【発明の効果】

本発明により得られた2G9抗体は、潜伏感染細胞のOM10.1細胞に対してもアポトーシスを誘導する作用があることが認められた。感染細胞に対してアポトーシスを誘導する作用が2G9抗体にあることが認められた。これに対し、非感染細胞のU937やMOLT-4細胞に対してはこのような傷害作用を示さなかった。この結果、潜伏感染細胞などに対してもアポトーシスを誘導できることから、化学療法剤が効果を発揮することが出来ない感染患者の体内に潜む潜伏感染を排除するための治療剤としても使用しうる。また、リコンビナント抗HIV抗体を作成するにあたり極めて有用な $\mu$ 鎖可変領域の塩基配列、及び $\kappa$ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子を提供する。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】2G9抗体の特異性を示す図面である。

フローサイトメトリー法で解析した結果、非感染細胞は2G9抗体で染色されずHIV感染細胞が染色されていることを示す（PBL:末梢血リンパ球）。

【図2】2G9抗体によるHIV感染細胞のアポトーシスを示す図面である。

HIVを感染させたMOLT-4/IIIB細胞に2G9抗体を $6.25\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し2日間培養すると、アポトーシス検出試薬Annexin V陽性で、死細胞検出試薬Propidium Iodide陽性細胞が53.5%に増加することを示す。

【図3】2G9抗体によるHIV潜伏感染細胞のアポトーシスを示す図面である。

HIVを感染させたOM10.1細胞に2G9抗体を12.5  $\mu$ g/mlの濃度で添加し、2日間培養すると、アポトーシス検出試薬Annexin V陽性細胞が22.8%に増加することを示す。

【図 4】 2G9  $\mu$  鎖発現プラスミド構築模式図を示す。

【 0 0 3 2 】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Noriko, Okada

Hidechika, Okada

<120> Human IgM monoclonal antibody that induce complement mediated cytolysis of activated human lymphocytes.

<130> T-070102-2

<150> 2002-227952

<151> 2002-07-01

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 401

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> variable region of human k-chain

<220>

<221> V-region

<222> (1)..(401)

<223>

<400> 1

tgtcaggaca cagcatggac atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct 60

ggttcccagg ttccagatgc gacatccaga tgaccacagtc tccatcttcc gtgtctgcat 120

ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggatattagc agctgggttag 180

cctggatatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcatccagtt 240

tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca 300

ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt 360

tcctctcac tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa a 401

<210> 2

<211> 481

<212> DNA

<213> Unknown



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; variable region of human m-chain

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; V-region

&lt;222&gt; (1)..(481)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 2

gctgaattct ggctgaccag ggcagtcacc agagctccag acaatgtctg tctccttcct 60

catcttcctg cccgtgctgg gcctcccatg ggggtgcctg tcacaggtac agctgcagca 120

gtcaggtcca ggactgggtga agcccgcgca gaccctctca ctcacctgtg ccctctccgg 180

ggacagtgtc tctagcaaca gtgctacttg gaactggatc aggcagtccc cattgagagg 240

ccttgagtgg ctgggaagga catactacag gtccaagtgg tataatgatt atgcagtatc 300

tgtgaaaagt cgaataacca tcaaccaga cacatccaag aaccagttct ccctgcagct 360

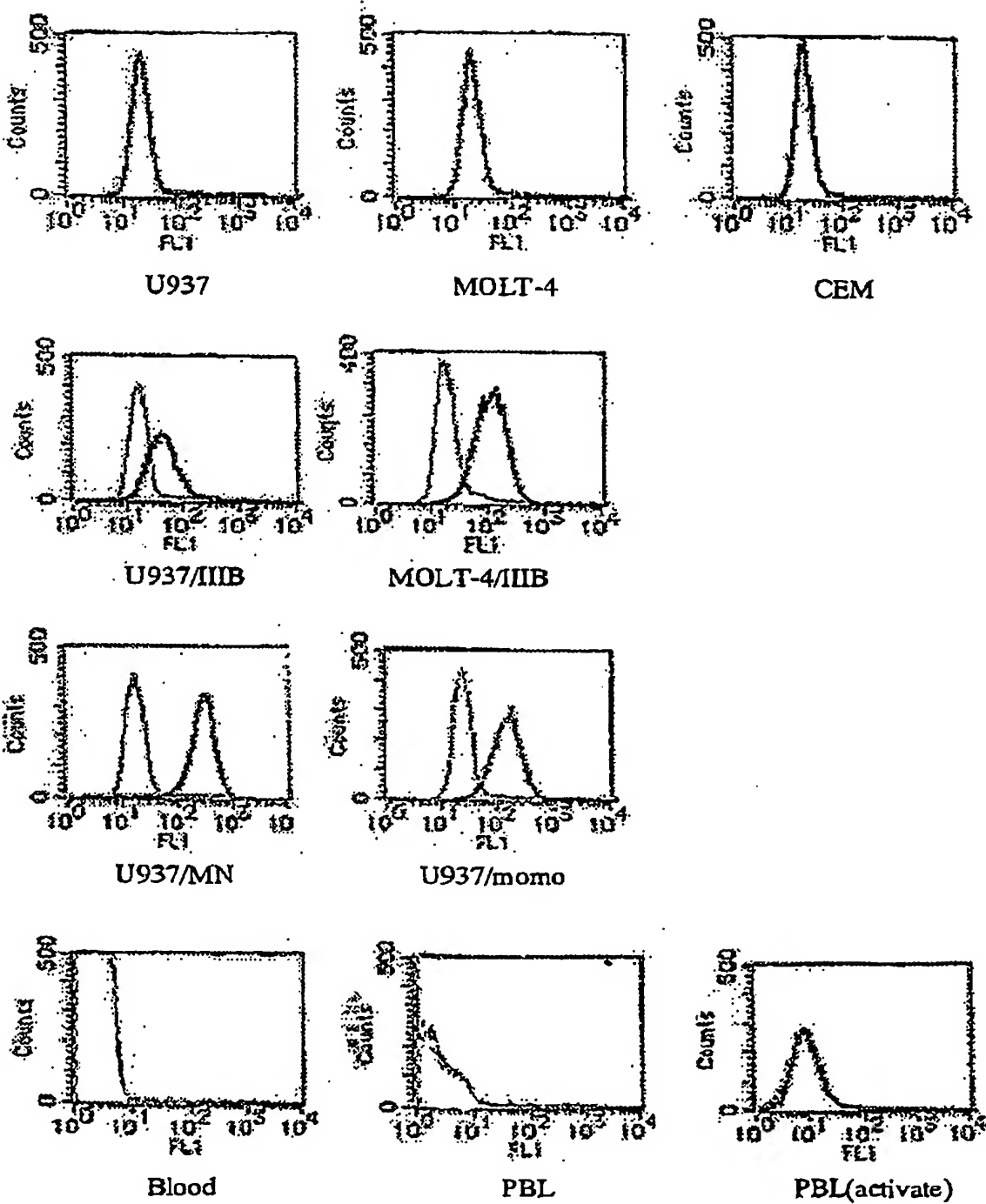
gaactctgtg actcccgagg acacggctgt gtattactgt gcaagagaga attactatgg 420

ttcggggagg tacaactggt tcgaccctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc 480

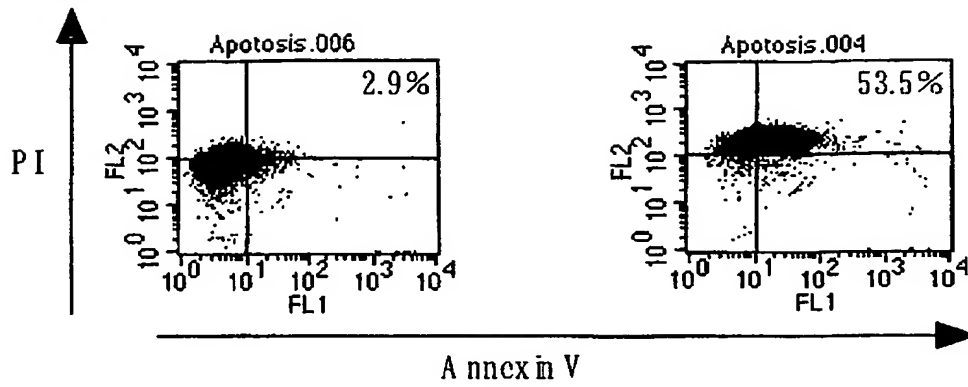
a 481

【書類名】 図面

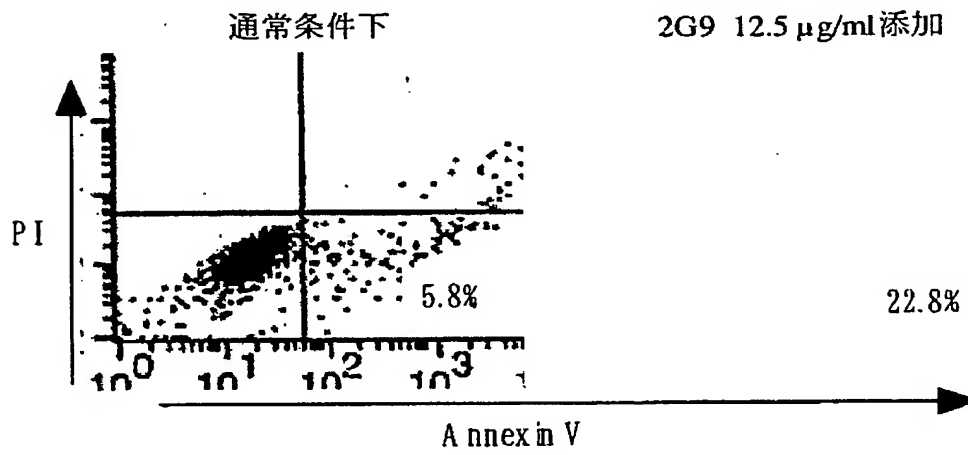
【図 1】



【図 2】



【図 3】





【書類名】 要約書

【要約】

【解決する課題】 HIV感染細胞に特異的に反応してアポトーシスを誘導するヒトIgM抗体および該ヒトIgM抗体を有効成分とするHIV感染の予防剤や治療剤等を提供すること。

【課題を解決する手段】 免疫グロブリンの遺伝子に関わるヒト染色体を導入したマウスにHIV感染培養細胞を免疫した動物の脾細胞をマウス骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマを作成し、クローニングしたハイブリドーマで、HIV感染細胞に特異的に反応し、HIV感染細胞やHIV潜伏感染細胞にアポトーシスを誘導するヒトIgMモノクローナル抗体を産生する細胞株を得た。

【選択図】 なし

特願 2003-074316

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[593186459]

1. 変更年月日

1993年10月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県福岡市城南区干隈1丁目5番1号

氏 名

岡田 秀親

2. 変更年月日

1996年 3月29日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番1号 エクレール桜  
山206号

氏 名

岡田 秀親

特願 2003-074316

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502282571]

1. 変更年月日

2002年 7月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール

桜山206

氏 名

岡田 則子

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**